

ÜBER EINE NEUE
ENTZÜNDUNGSHEMMENDE SUBSTANZ

(Versuch mit einem Derivat der 2,5-Dihydroxybenzoesäure)

Karl-Heinz Zinn

1972
—

ÜBER EINE NEUE
ENTZÜNDUNGSCHEMME SUBSTANZ

(Versuche mit einem Derivat der 2, 5-Dihydroxybenzoesäure)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karl-Heinz Zinn
aus Donaueschingen

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. STICKL
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. SPIESS
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 7.3.1972



DISPOSITION

I.	EINLEITUNG	5
	Allgemeines über die Prüfung antiphlogistischer Substanzen	
	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	
II.	MATERIAL UND METHODIK	7
	- FL-70: Definition und Bezeichnung der Substanz	7
	- Versuchstiere	7
	- Statistische Auswertung	7
III.	DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE DER VERSUCHE	8
	1) Der Einfluss von FL-70 auf die Gefäßpermeabilität, dargestellt am lokalen Entzündungsreiz mittels Pyrexal R	8
	2) Der Einfluss von FL-70 auf die formalininduzierte Peritonitis der Ratte	11
	3) Der Einfluss von FL-70 auf das Formalin-Macrodexödem der Rattenpfote	13
	4) Der Einfluss von FL-70 auf die Terpentinölentzündung am Kaninchen	15
	5) Der Einfluss von FL-70 auf den Granulombeutelttest nach SELYE	17
	6) Der Einfluss von FL-70 auf die cutane und intracutane Vacciniainfektion des Kaninchens	19
	7) Der Einfluss von FL-70 auf die experimentell allergische Encephalomyelitis (EAE) des Kaninchens	20
	8) Der Einfluss von FL-70 auf die Senfölschämie des Kaninchens	24
	9) Der Einfluss von FL-70 auf die Fermentaktivität der alkalischen Phosphatase, der sauren Phosphatase, der Cholinesterase, der Leucinaminopeptidase, der Glukose-6-phosphatdehydrogenase, des Trypsins und des Chymotrypsins	26

IV. DISKUSSION

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. LITERATURVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG

Die Entzündungsforschung bietet eine große Anzahl von Untersuchungsmethoden zur Prüfung der Wirksamkeit antiphlogistischer Substanzen an (Lit. s. b. WILHELMI, 1958; WILHELMI, 1966; WINTER, 1966; LINDNER, 1968). WILHELMI (1966) teilt die Entzündungstests in solche über akute, subchronische und spezielle Entzündungen ein. Zu den akuten Entzündungen zählen z. B. das U-V-Erythem des Meerschweinchens, die Formalinperitonitis der Ratte, die durch Silbernitrat erzeugte Pleuritis der Ratte, das Formalinödem der Rattenpfote und die nicht ganz so akut verlaufenden Kaolin-, Bolus alba- oder Carragenpfotenödeme. Subchronische Entzündungsmodelle lassen sich durch den Granulombeutel Test nach SEYLE, den Watte-Granulom Test nach MEIER und Mitarbeiter oder durch speziellere Methoden wie die Silbernitrat-Arthritis der Ratte und hyperergische Entzündungsformen (Tuberkulin-Reaktion, Arthus-Phänomen beim Meerschweinchen, Dinitrochlorbenzol-Ekzem des Meerschweinchens) erzeugen. Zur Klärung besonderer Fragen, wie der Reißfestigkeit des Granulationsgewebes oder der biochemischen Vorgänge im Wundgebiet, stehen eine Reihe spezieller Entzündungstests zur Verfügung, auf welche hier nicht eingegangen werden soll (s. hierzu: LINDNER, 1966; VOGEL, 1970).

Bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Prüfsubstanz FL-70⁺ handelt es sich um ein chinoides Derivat der 2, 5-Dihydroxybenzoesäure mit Elektronen-Akzeptor-Donator-Funktion. Die Substanz ist nicht kristallisierbar und stand als rein wässrige, klare, rötliche Lösung mit einem pH-Wert von 6,6 zur Verfügung. Bei dem chemischen Abbau von FL-70 treten einfache Spaltprodukte auf wie p-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Vanillinsäure. Die akute LD₅₀ beträgt 500 mg/kg Maus (MACH).

FL-70 kann vermutlich zu den Anti-Entkoppler-Substanzen der Atmungskette gezählt werden, denn es zeigt eine Reihe von Eigenschaften, die dafür zu sprechen scheinen: FL-70 senkt die Körpertemperatur sowohl der Normalratte wie der Fiebrerratte, während Entkoppler die Körpertemperatur der Versuchstiere steigern, da ein Teil der Energie aus der Bioenergetik als Wärme freigesetzt wird, statt in Form von ATP gespeichert zu werden. Ferner steigert FL-70 die Kontraktionskraft am Herzvorhofpräparat, was auf eine Verbesserung des Wirkungsgrades

⁺) Laboratorium für Grenzflächenphysik und Kolloidchemie Dr. Ch. Mach
 8011 München-Kirchseeon

der Atmungskette oder auf eine positive Beeinflussung der mechanochemischen Energieumwandlung hinweist. Der PO-Quotient (Rattenlebermitochondrien) kann durch FL-70 gesteigert werden (MACH, 1971). Anti-Entkoppler-Substanzen der Atmungskette wirken einer Hemmung der ATP-Synthese der Zelle entgegen und fördern somit die Mechanismen der Bioenergetik. Zu diesem Fundament einer jeden lebenden Zelle zählt man heute nicht nur den Zitronensäure-Zyklus und die Atmungskettenphosphorylierung, sondern auch die zahlreichen kybernetischen Mechanismen und die Mechanismen der Energieverwertung, z. B. durch gerichtete (vektorielle) Enzymkatalyse. Manche von ihnen werden "Ionen-Pumpen" genannt. Selbst heute kennen wir die Funktion keines einzigen der zahlreichen biochemischen Transportsysteme in allen Einzelheiten (WINTER, 1971).

Bei perkutaner Medikation an der Schleimhaut des Auges, der Nase und des Mundes fiel MACH die antientzündliche Wirkung von FL-70 auf. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Substanz einer näheren Untersuchung unterzogen. Dabei sollten folgende Fragen erörtert werden:

- 1) besitzt FL-70 antiphlogistische Eigenschaften?
- 2) kann durch FL-70 eine Virusinfektion (Vaccinia-Virus) beeinflusst werden?
- 3) vermag FL-70 die Aktivität verschiedener Enzyme zu hemmen?

II. MATERIAL UND METHODIK

1) FL - 70

Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Versuche FL-70 in einer sterilen wässrigen Lösung einer Ausgangskonzentration von 0,6 % angewandt; die Lösung wurde bezüglich des pH-Wertes und des osmotischen Druckes dem Blut angeglichen, indem sie im Verhältnis 1:10 mit 9 %iger NaCl-Lösung versetzt und der pH-Wert mit NaOH auf 7,2 eingestellt wurde.

2) Versuchstiere waren

- a) konventionell gehaltene weibliche Albinokaninchen (weiße Neuseeländer) mit einem Gewicht von 2-3 kg. Bei Bedarf wurden die Tiere an der Rücken- und/oder Bauchhaut mit BaSO_4 enthaart
- b) konventionell gehaltene weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 250-300 g.

3) Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach den wissenschaftlichen Tabellen von GEIGY unter Anwendung des Student-t-Tests.

III. DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE DER VERSUCHE

- 1) Der Einfluß von FL-70 auf die Gefäßpermeabilität, dargestellt am lokalen Entzündungsreiz mittels Pyrexal^R

Versuchsanordnung

Vier Kaninchen bekamen Pyrexal^R (hochgereinigtes, proteinfreies, wasserlösliches Lipopolysaccharid aus *Salmonella abortus equi*, 1 Gamma Wirkstoff pro 1 Ampulle à 2 cm³. Hersteller: Dr. WANDER GmbH) intrakutan in die enthaarte Rückenhaut injiziert, und zwar erhielt jedes Tier 2 Quaddeln, eine mit dem Injektionsvolumen von 0,3 ml, die andere mit dem Injektionsvolumen von 0,5 ml. Damit wurde ein lokaler Entzündungsreiz erzeugt (VORLAENDER, 1956; HEILMAYER, 1966). Unmittelbar nach der Pyrexalinjektion bekam das 1. Tier 3,8 ml FL-70 0,13 % (= 5 mg), das 2. Tier 11,4 ml FL-70 0,13 % (= 15 mg) und das 3. Tier 15,2 ml FL-70 0,13 % (= 20 mg) i.v. appliziert; das 4. Tier diente zur Kontrolle und wurde nicht mit FL-70 behandelt. Die Darstellung der durch den lokalen Entzündungsreiz erhöhten Gefäßpermeabilität erfolgte im modifizierten MENKIN-Test: 30 Minuten später wurde jedem Tier 2,5 ml erwärmtes Trypanblau 1 % intravenös verabreicht (BOAKE und LOVELL, 1954; KÜSTER, 1968; HARRISON and O'DONELL, 1970).

Nach weiteren 30 Minuten wurden zunächst in halbstündlichen, dann in stündlichen Abständen 1. die Durchmesser der entstandenen Blauhöfe und 2. die Hautdickenzunahmen an den Pyrexalquaddeln mit einem in der Veterinärmedizin gebräuchlichen Cutimeter (Fa. Hauptner) bestimmt.

Ergebnis

In Abb. 1 und 2 (s. Seiten 9 u. 10) sind die Durchmesser der Blauhöfe und die Hautdickenzunahmen an den Pyrexalquaddeln in Abhängigkeit zur Zeit dargestellt. Die graphischen Darstellungen lassen eine dosisabhängige Hemmung der Exsudation durch FL-70 erkennen.

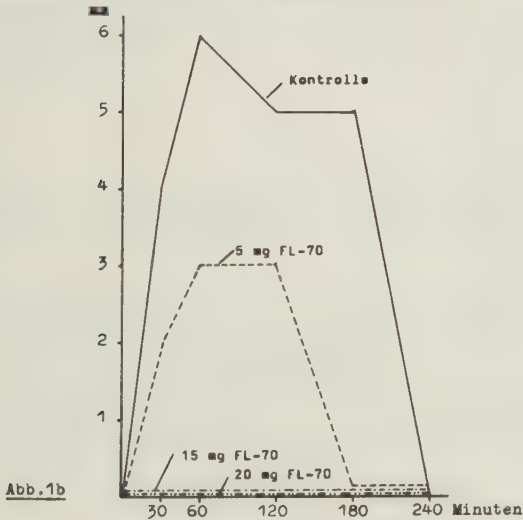
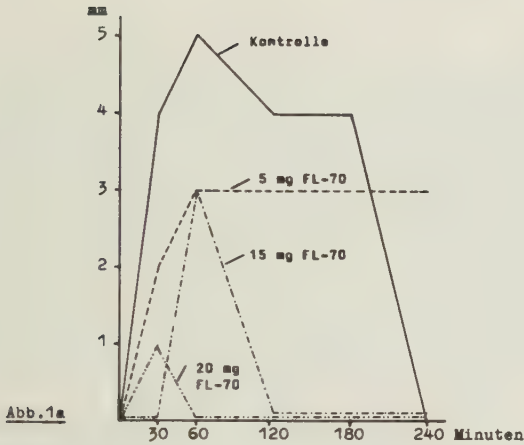


ABBILDUNG 1a und 1b

Verhalten der Blauhofdurchmesser an den Pyrexalquaddeln
(Abb.1a: 0,3 ml Pyrexal i.c.; Abb.1b: 0,5 ml Pyrexal i.c.)
bei 4 Kaninchen mit unterschiedlicher Dosierung von FL-70

Abszisse: Zeit nach Trypanblau-Injektion

Ordinate: Durchmesser der Blauhöfe in mm

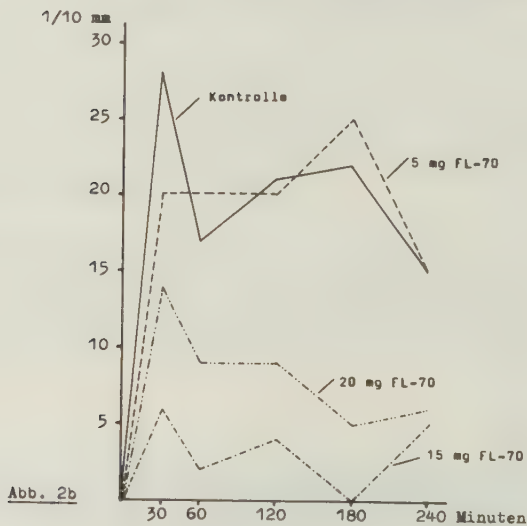
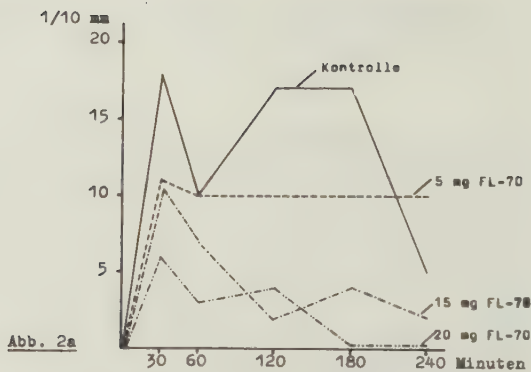


ABBILDUNG 2a und 2b

Verhalten der Hautdicken an den Pyrexalquaddeln (Abb. 2a: 0,3 ml Pyrexal i. c.; Abb. 2b: 0,5 ml Pyrexal i. c.) bei 4 Kaninchen mit unterschiedlicher Dosierung von FL-70

Abszisse: Zeit nach Trypanblau-Injektion

Ordinate: Hautdickenzunahme in 1/10 mm

2) Der Einfluß von FL-70 auf die formalininduzierte Peritonitis der Ratte

Versuchs-anordnung

Es wurden zwei Gruppen zu je 10 Ratten gebildet. Zur Erzeugung der Formalinperitonitis (TEDESCHI, WILHELMI und MARTINI, 1958; WILHELMI, 1958; WILHELMI, 1963; WILHELMI, 1966; GDYNIA, 1968) wurde den Tieren der einen Gruppe je 1,0 ml Formalin 2 % + 0,5 ml NaCl-Lösung 0,9 %, den Tieren der anderen Gruppe 1,0 ml Formalin 2 % + 0,5 ml FL-70 0,5 % (= 2,5 mg) intraperitoneal in leichter Äthernarkose injiziert. Die Tiere der letzteren Gruppe bekamen zudem noch 1 ml FL-70 0,5 % (= 5 mg) eine Stunde vor und 0,5 ml FL-70 0,5 % (= 2,5 mg) eine Stunde nach der peritonealen Reizung ebenfalls in leichter Äthernarkose intramuskulär injiziert (jedes Tier dieser Gruppe erhielt insgesamt also 10 mg FL-70).

Neun Stunden nach der Formalininjektion wurden die Tiere durch Ätherinhalation getötet und 1. die Menge des Peritonealexsudates, 2. die Leukozytenzahl im Exsudat und 3. der Eiweißgehalt des Exsudates bestimmt.

Ergebnis

In Tab. 1 (s. Seite 12) sind Exsudatmenge, Zellzahl und Eiweißgehalt des Exsudates zusammengefaßt. Eine Beeinflussung des Leukozyten- und Eiweißgehaltes durch FL-70 ist nicht zu entnehmen.

Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß FL-70 eine statistisch gesicherte Hemmung der Exsudation bewirkte (Abb. 3, s. Seite 13). Der prozentuale Wert der Exsudathemmung betrug 30,2 %⁺⁾ . Von den in Abb. 3 dargestellten Versuchsergebnissen wurde Tier Nr. 1 und Nr. 9 ausgeschlossen, da die Formalininjektion offensichtlich nicht vollständig intraperitoneal gelang, ferner Tier Nr. 10, da es noch vor Versuchsende verstarb.

⁺⁾

$$\% \text{ Hemmung} = 100 - \left(\frac{\text{Behandlung}}{\text{Kontrolle}} \times 100 \right)$$
 ((nach HENDERSHOT und FORSAITH, 1959))

TABELLE 1

Menge, Leukozytenzahl und Eiweissgehalt des Peritonealexsudats nach
Stunden nach intraperitonealer Reizung mit Formalin

	Tier Nr.	Exsudatmenge in ml	Leukozyten/mm ³ im Exsudat	Eiweissgehalt des Exsudats in g/100 ml
Kontrolle	1	0,98	1600	11,0
	2	6,04	800	5,33
	3	5,80	600	6,46
	4	6,64	300	5,55
	5	4,64	650	7,33
	6	4,23	630	5,80
	7	6,61	480	7,48
	8	5,84	3700	13,10
	9	0		
	10	Tier vor Versuchsende verstorben		
Behandlung mit FL-70	11	5,81	1430	5,81
	12	2,49	980	6,29
	13	5,07	280	6,29
	14	3,51	230	8,66
	15	5,00	300	6,17
	16	3,24	500	5,11
	17	5,03	480	7,58
	18	4,18	400	5,92
	19	5,84	230	6,66
	20	3,46	250	6,85

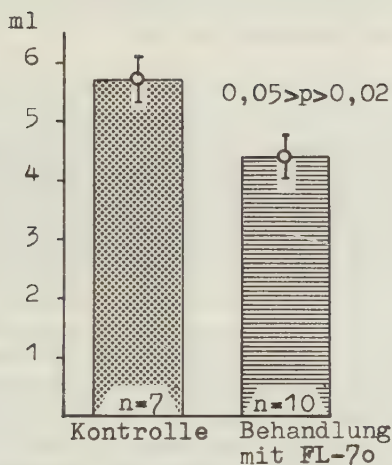


ABBILDUNG 3

Mittlere Exsudatmenge in ml.

Die vertikalen Balken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an. p = Wahrscheinlichkeit bezogen auf die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte

3) Der Einfluß von FL-70 auf das Formalin-Macrodexoedem der Rattenpfote.

Versuchsordnung

Es wurden zwei Gruppen zu je 15 Ratten gebildet. Das Formalin-Macrodexoedem der Rattenpfote (WILHELMI und DOMENJOZ, 1950; WILHELMI, 1952; HILLEBRECHT, 1954; DOMENJOZ, MÖRSDORF, STENGER und THEOBALD, 1957; WILHELMI, 1958; WAGNER-JAUREGG und JAHN, 1963, WILHELMI, 1966) wurde an allen Tieren in leichter Äthernarkose durch subsutane Injektion von Formalin (0,1 ml, 3%) und Dextran (Macrodex^R 0,05 ml, 3%) in die Planta pedis der rechten Hinterpfote erzeugt. Die Tiere der einen Gruppe bekamen 30 Minuten vor der Oedemauslösung 3 ml FL-70 0,13%

(= 3,9 mg) subcutan gespritzt, während die andere Gruppe als Kontrolle diente und nicht behandelt wurde.

Am Höhepunkt der Schwellung (135 Minuten nach Oedemauslösung) wurden die Tiere durch Ätherinhalation getötet, die Hinterpfoten im Tarso-Cruralgelenk amputiert und durch Gewichtsvergleich von rechter und linker Pfote die Schwellungszunahme der kranken (rechten) Pfote ermittelt (die Volumendifferenz zwischen rechter und linker Pfote beträgt nach WAGNER-JAUREGG (1963) weniger als 2% und kommt daher als evtl. Fehlerquelle nicht in Betracht).

Ergebnis

Die mit FL-70 behandelten Tiere zeigten gegenüber der Kontrollgruppe eine prozentuale Oedemhemmung von 13,9%. Wegen der großen Streuung der mittleren Schwellungszunahmen von der Kontrollgruppe und der mit FL-70 behandelten Tieren konnte die Oedemhemmung statistisch jedoch nicht gesichert werden (Abb. 4).

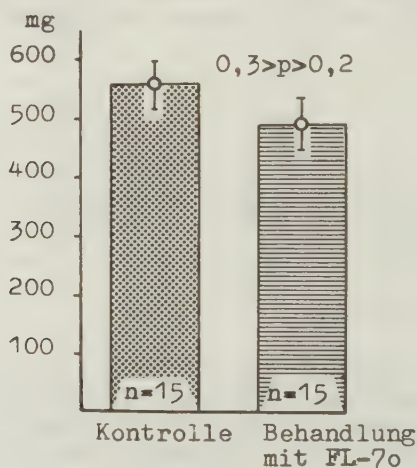


ABBILDUNG 4

Mittlere Schwellungszunahme der Rattenpfote in mg
Die vertikalen Balken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an. p = Wahrscheinlichkeit bezogen auf die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte

- 4) Der Einfluß von FL-70 auf die Terpentinölentzündung am Kaninchen.

Versuchsanordnung

Zwölf Kaninchen wurden mit Nembutal^R narkotisiert und bekamen anschließend 0,2 ml reines Terpentinöl in die enthaarte Bauchhaut injiziert. Es wurde streng darauf geachtet, daß die Intracutanquaddeln genau in die Medianlinie und am tiefsten Punkt des Bauches bei natürlicher Stellung zu liegen kamen, denn in Vorversuchen erwies es sich, daß anderenfalls die entstehenden Oedeme nach unten abzusacken begannen, und somit eine Beurteilung der Hautdickenzunahmen am Injektionsort nicht mehr möglich war. Die eine Hälfte der Versuchstiere bekam unmittelbar danach, ferner nach 24, 48 und 72 Stunden 15 ml FL-70 0,13% (= 19,5 mg) intravenös appliziert, während die andere Hälfte der Tiere als Kontrolle diente und nicht behandelt wurde.

6, 24, 48 und 72 Stunden nach der Terpentinölinjektion wurden mit dem Cutimeter die Hautdickenzunahmen an den Terpentinquaddeln gemessen.

Ergebnis

Die mit FL-70 behandelten Tiere zeigten gegenüber der Kontrollgruppe erheblich geringere Hautdickenzunahmen (Abb. 5, s. Seite 16). Die Differenz zwischen beiden Gruppen trat bei zunehmender Beobachtungsdauer immer deutlicher zu Tage.

Am 4. Beobachtungstag zeigte es sich ferner, daß nur ein Tier der behandelten Gruppe am Injektionsort eine kleine trockene Nekrose entwickelte, während von der Kontrollgruppe drei Tiere Colliquationsnekrosen aufwiesen.

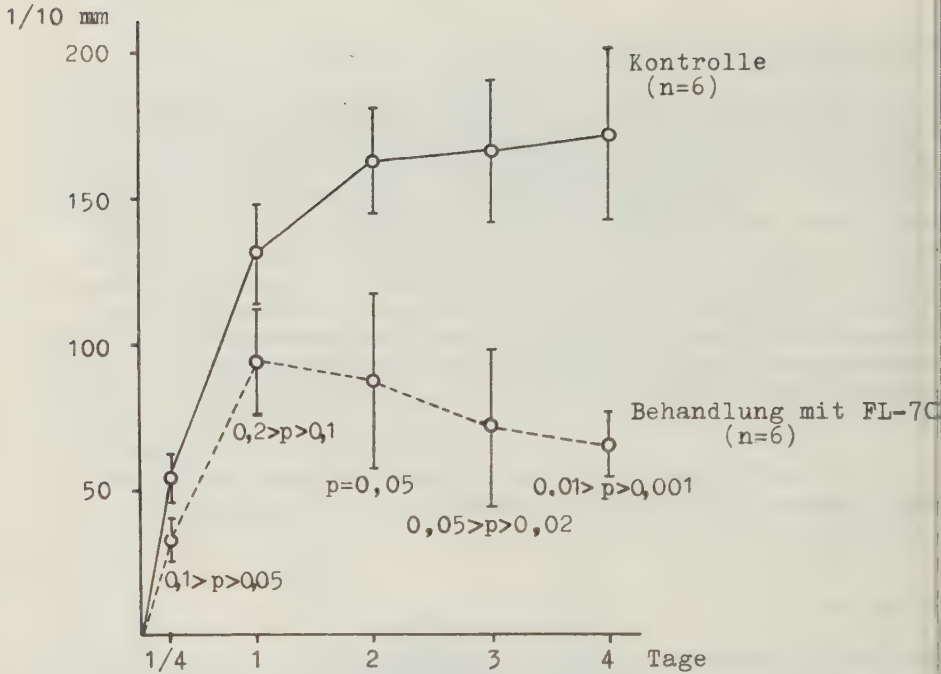


ABBILDUNG 5

Verhalten der Hautdicken an den Terpentinölquaddeln bei 2 Gruppen zu je 6 Kaninchen (——— Kontrolle; ----- Behandlung mit 20 mg FL-70 i.v. am Tag der Terpentinölinjektion und am 1., 2. u. 3. Tag danach).

Abszisse: Zeit nach Terpentinölinjektion in Tagen.

Ordinate: Hautdickenzunahme in 1/10 mm.

Die vertikalen Balken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an. p = Wahrscheinlichkeit bezogen auf die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte.

5) der Einfluß von FL-70 auf den Granulombeutelttest nach SELYE.

Versuchsordnung

Nach der Methode von SELYE (SELYE, 1953; WILHELM, 1958; WILHELM, 1966; WINTER, 1966) wurden bei 20 Ratten am Rücken je 25 ml Luft und in die entstandene Tasche je 1 ml Öl (Gemisch aus Krotonöl und reinstem Knochenöl ^{+) im Verhältnis 1 : 100) subcutan injiziert. Die eine Hälfte der Versuchstiere bekam eine Stunde vor und eine Stunde nach der Ölinjektion 1 ml FL-70 0,39% (= 3,9 mg), ferner an jedem Tag bis zum Versuchsende 1 x tägl. 1 ml FL-70 0,39% in kurzer Äthernarkose intramuskulär injiziert. Die andere Hälfte der Tiere diente als Kontrolle und bekam an Stelle von FL-70 jeweils physiol. NaCl-Lösung injiziert (ebenfalls in kurzer Äthernarkose).}

Am 15. Tage nach Versuchsbeginn wurden die Ratten durch Ätherinhalation getötet und die deutlich prominenten und palpablen Granulombeutel sorgfältig herauspräpariert. Es wurden 1. die Exsudatmenge und 2. das Gewicht der entleerten Beutel bestimmt.

Ergebnis

Durch FL-70 wurde die Exsudation in die Granulomtasche beträchtlich eingeschränkt (Abb. 6, s. Seite 18). Ein Kontrolltier, bei welchem das Exsudat durch eine am Granulombeutel entstandene Nekrose ausgelaufen war, und ein mit FL-70 behandeltes Tier, welches noch vor Versuchsende verstarb, konnten für die in Abb. 6 dargestellten Versuchsergebnisse nicht verwertet werden.

Bei der Präparation der getöteten Tiere fiel auf, daß das Exsudat der behandelten Tiere zum Unterschied zu dem der Kontrolltiere überwiegend bereits im Stadium der Organisation war.

Durch Wägung der entleerten Granulombeutel ließ sich ferner eine deutliche Hemmwirkung von FL-70 auf die Ausbildung des Granulationsgewebes objektivieren (Abb. 7, s. Seite 19). Von den in Abb. 7 dargestellten Versuchsergebnissen wurden 2 mit FL-70 behandelten Tiere ausgeschlossen, da ein Tier noch vor Versuchsende verstarb und da bei dem anderen Tier das Granulomgewicht extrem von den übrigen Werten abwich, so daß dieser Wert statistisch nach CHAUVENETs Kriterium ausgeschlossen werden konnte.

+) Oleum pedum tauri officinale

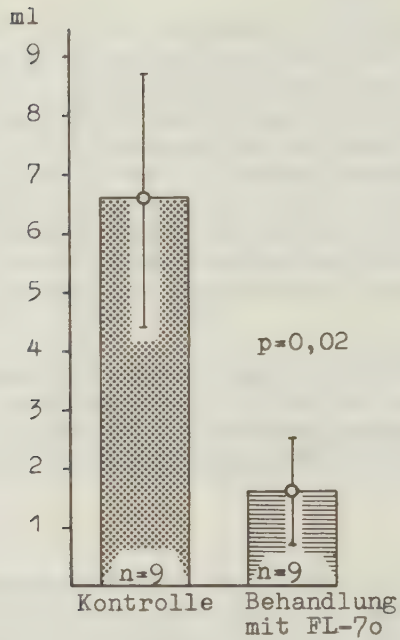


ABBILDUNG 6

Mittlere Exsudatmenge der Granulombeutel in ml.

Die vertikalen Balken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an. p = Wahrscheinlichkeit bezogen auf die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte.

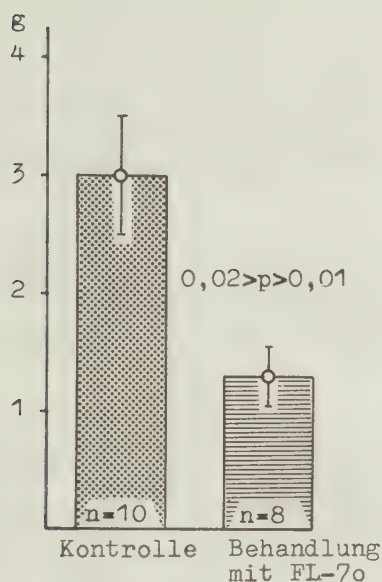


ABBILDUNG 7

Mittleres Gewicht der entleerten Granulombeutel in Gramm. Die vertikalen Balken geben die Standardabweichung des Mittelwertes an. p = Wahrscheinlichkeit bezogen auf die Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte.

6) Der Einfluß von FL-70 auf die cutane und intracutane Vaccinia-Infektion des Kaninchens.

Versuchsordnung

Zehn Kaninchen wurden cutan und intracutan mit Vaccinia-Virus beimpft (HUBER, HOCHSTEIN-MINTZEL und STICKL, 1971). Impfstoff war eine Dermovaccine vom Rind, Stamm Elstree (Charge Nr. 10/70) mit einem Titer von $2,7 \times 10^8$ pfu/ml (= plaquesforming units auf der Corioallantoismembran embryonierter Hühnereier). Der Impfstoff wurde in Zehnerpotenzen bis zu einem Virusgehalt von $2,7 \times 10^3$ pfu/ml

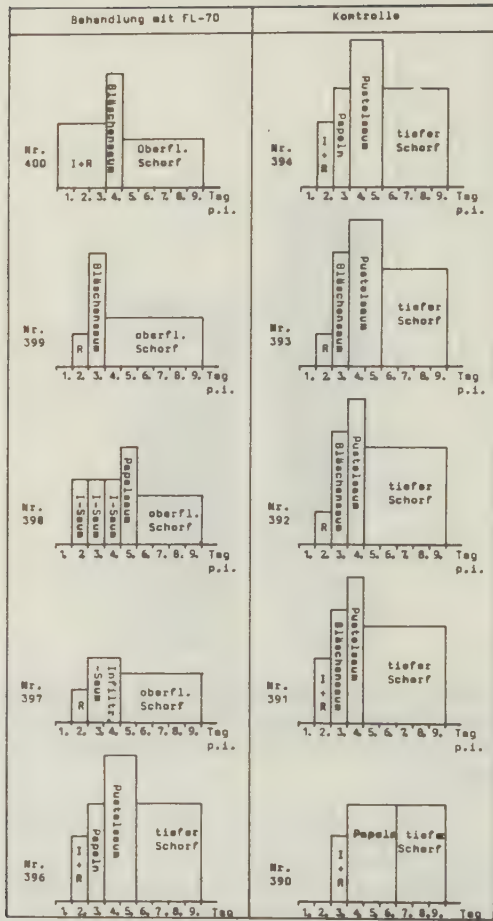


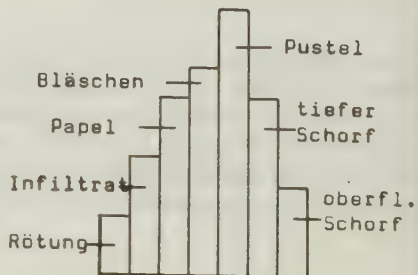
ABBILDUNG 8

Entzündliche Reaktionen an den
Impfschnitten mit der Viruskon-
zentration
 $2,7 \times 10^7$ pfu/ml.

Die Höhe der Säulen steht in Kor-
relation zum Ausmass der ent-
zündlichen Reaktion (vgl. neben-
stehende Abbildung).

I = Infiltrat,

R = Rötung



in steriler physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Von den sechs Viruskonzentrationen ($2,7 \times 10^8$ pfu/ml - $2,7 \times 10^3$ pfu/ml) erhielt jedes Kaninchen auf der enthaarten Rückenhaul mit Hilfe einer Tuberkulinspritze je 1 Intracutanquaddel (Injektionsvolumen 0,2 ml) und je 1 Impfschnitt von etwa 3 cm Länge. Fünf Tiere bekamen 1 Stunde vor der Impfung, sowie vom 1. bis 8. Tag danach täglich 5 ml FL-70 0,41% (= 20,6 mg) i.v. gespritzt. Die restlichen fünf Tiere dienten als Kontrolle und wurden nicht behandelt.

Bis zum 9. Tag p.i. wurden täglich 1. die entzündlichen Begleiterscheinungen an den Impfschnitten registriert und 2. die Hautdickenzunahmen an den Impfquaddeln mit Hilfe eines Cutimeters gemessen.

Ergebnis

Bei der Messung der Hautdickenzunahmen an den Impfquaddeln zeigten die Tiere der Kontrollgruppe gegenüber den mit FL-70 behandelten Tiere keine Unterschiede.

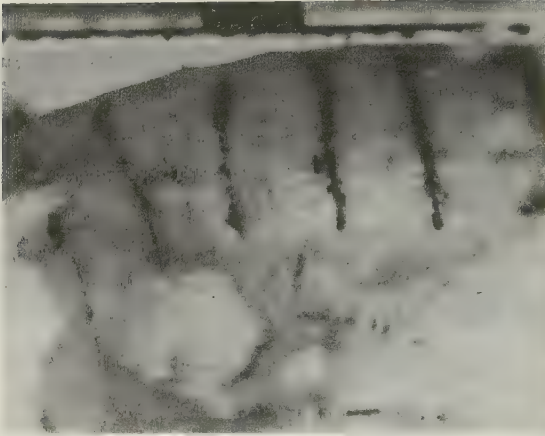
Die entzündlichen Reaktionen an den Impfschnitten waren jedoch bei der Mehrzahl der mit FL-70 behandelten Tiere gegenüber den Kontrolltieren deutlich abgeschwächt. Abb.8 (s. Seite 20) versucht dies am Ablauf der entzündlichen Reaktionen an den Impfschnitten mit der Viruskonzentration $2,7 \times 10^7$ pfu/ml zu verdeutlichen. Es ist ersichtlich, daß nur ein behandeltes Tier eine Pustelreaktion entwickelte, während vier Kontrolltiere eine Pustelreaktion zeigten. Diese Verhältnisse fanden sich im Wesen auch bei den übrigen Impfschnitten. Abb.9a und 9b zeigen die Impfschnitte an einem behandelten und an einem Kontrolltier am 4. Tag nach der Infektion (s. Seite 22).

- 7) Der Einfluß von FL-70 auf die experimentell allergische Encephalomyelitis (EAE) des Kaninchens.

Versuchsanordnung

Die Präparation eines Antigens aus heterologem ZNS-Gewebe erfolgte nach der Beschreibung von LEVIN (1967): 4 Teile ZNS-Gewebe (vorwiegend weiße Substanz) vom Rind (aufbewahrt im gefrorenen Zustand) wurden homogenisiert mit 6 Teilen physiologischer NaCl-Lösung. Das Homogenat wurde emulgiert in 10 Teilen komplettem Freund' schem

9 a)



9 b)

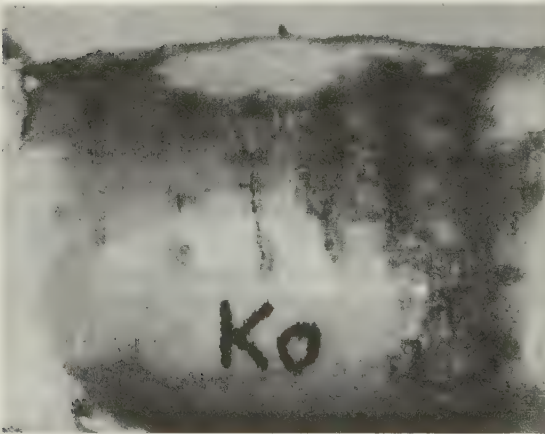


ABBILDUNG 9a u. 9b

Reaktionen an den Impfschnitten mit den Viruskonzentrationen $2,7 \times 10^8$ pfu/ml - $2,7 \times 10^3$ pfu/ml am 4. Tag nach der Infektion (die Viruskonzentrationen an den Impfschnitten nehmen von rechts nach links in Zehnerpotenzen ab).

Abb. 9a = mit FL-70 behandeltes Tier (Nr. 397)

Abb. 9b = unbehandeltes Kontrolltier (Nr. 394)

Adjuvans (8,5 Teile Bayol F + 1,5 Teile Arlachel A + abgetötete Tuberkelbakterien 4 mg/ml) und anschließend 45 Minuten auf 60° C zur Keimverminderung erhitzt. 20 Tiere wurden dann nach einem von KUWERT (1968) angegebenen Verfahren immunisiert, indem 6 Inokulationen à 0,1 ml des beschriebenen Antigens gleichzeitig intradermal in die Planta pedis aller 4 Gliedmaßen und an den seitlichen Brustwänden vorgenommen wurden (die Injektionen erfolgten in Nembutalnarkose). Zusätzlich bekamen alle Tiere 24 Stunden später 0,5 ml des Antigens ohne Adjuvans intramuskulär appliziert. Die Hälfte der Versuchstiere wurde wechselweise intravenös (5 ml) und intramuskulär (3 ml) mit FL-70 behandelt: am Tag der Immunisierung und am folgenden Tag mit 5 ml FL-70 0,37% (= 18,5 mg), vom 2. bis 9. Tag p.i. mit 3 ml FL-70 0,37% (= 11,1 mg), vom 10. bis 25. Tag p.i. mit 5 ml FL-70 0,37% und vom 26. bis 36. Tag p.i. mit 3 ml FL-70 0,37%.

Die Tiere wurden über 5 Wochen hin täglich untersucht, um evtl. Lähmungserscheinungen festzuhalten. Am 23. Tag und am 36. Tag p.i. wurde bei allen Tieren 0,6 - 1,0 ml Liquor cerebrospinalis aus der Cysterna cerebello-medullaris durch Punktion mit einer Kanüle Nr. 12 gewonnen.

Ergebnis

In Tab. 2 sind die Tiere eingetragen, welche klinisch an Encephalitis erkrankten. Wegen der geringen klinischen Erkrankungsrate konnten hier keine weiteren Aussagen gemacht werden.

TABELLE 2

Während einer Beobachtungszeit von 5 Wochen an Encephalitis erkrankte Tiere (Gesamtzahl der Kontrolltiere: 10; Gesamtzahl der mit FL-70 behandelten Tiere: 10).

	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche
Kontrolltiere		Nr. 81	----- +		
n = 10			Nr. 47 -----		
			Nr. 255 -----		
Behandlung			Nr. 120 -----		
mit FL-70			Nr. 117 -----		
n = 10			Nr. 014 -----		
					Nr. 2 ---

Tab. 3 (s. Seite 25) zeigt, daß unter Berücksichtigung der Laboruntersuchungen fast alle Tiere an Encephalitis erkrankten. Eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes der experimentell allergischen Encephalomyelitis durch FL-70 konnte also nicht erzielt werden.

8) Der Einfluß von FL-70 auf die Senfölschemosis des Kaninchens.

Versuchsanordnung

Bei 11 Kaninchen wurde an beiden Augen eine Chemosis nach der von HEUBNER und ALBATH (1939) beschriebenen Methode erzeugt: 1 Tropfen einer 50 %igen Allylsenföls-Lösung in reinem Olivenöl wurde jeweils in den Bindehautsack des linken und des rechten Auges gegeben. 15 Minuten nach Applikation des Senföls wurde in das rechte Auge 1 Tropfen FL-70 0,32% (= ca. 0,04 ml = ca. 0,2 mg) eingeträufelt; das linke Auge wurde zur Kontrolle in gleicher Weise mit physiologischer NaCl-Lösung behandelt. Diese Behandlung wurde 18 mal in 15-Minuten-Abständen wiederholt, wobei aber beim 10. mal die Tiere anstelle von FL-70 und der NaCl-Lösung in beide Augen wieder je 1 Tropfen Senföl bekamen. An den folgenden 5 Tagen wurden den Tieren je 2 Tropfen FL-70 bzw. NaCl-Lösung 4 mal in 15-Minuten-Abständen in die Augen geträufelt.

Die Augen wurden täglich (Beobachtungsdauer 5 Tage) hinsichtlich ihrer entzündlichen Reaktionen beurteilt.

Ergebnis

Während einer Beobachtungszeit von 5 Tagen konnte zwischen rechtem (mit FL-70 behandeltem) und linkem (Kontrolle) Auge kein Unterschied in der Heilungstendenz nachgewiesen werden. Nach 5 Tagen waren die akut-entzündlichen Erscheinungen vollständig abgeklungen und es bestanden an beiden Augen in gleichem Ausmaß stabile Resttrübungen der Cornea.

TABELLE 3

Liquorbefunde der mit EAE-Antigen immunisierten Kaninchen

	Tier Nr.	Liquor (23. Tag p.i.) Leukozyten/cmm	Liquor (36. Tag p.i.) Leukozyten/cmm	Eiweiss mg%
Kontrolle	100	130	290	250
	47	295	210	118
	390	105	105	114
	391	7	7	46
	394	2500	80	146
	020	37 2)		
	255	528	250	120
	051	1) 2)		
	026	35	70	88
	81	3)		
Behandlung mit FL-70	120	295	220	133
	16	17	22	103
	119	100	570	147
	117	92	260	266
	3	155	80	138
	4	7	300	230
	7	147	370	149
	2	35	462	502
	014	147	280	203
	6	1) 2)		

- 1) Der Liquor konnte auch bei wiederholtem Versuch nicht gewonnen werden.
- 2) Die Tiere starben an den Folgen der ersten Liquorpunktion
- 3) Das Tier starb am 18. Tag an den Folgen der EAE.

Normalwerte des Liquors bei Kaninchen (nach FRICK und SCHEID-SEY-DEL, 1962):

Zellzahl: 0 - 15/3
 Gesamteiweiss: 21 mg% $\pm$ 11,4

- 9) Der Einfluß von FL-70 auf die Fermentaktivität der alkalischen Phosphatase, der sauren Phosphatase, der Cholinesterase, der Leucinaminopeptidase (Leucin-Arylamidase, LAP), der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH), des Trypsins und des Chymotrypsins

Versuchsanordnung

Alle Aktivitätsbestimmungen erfolgten photometrisch (Photometer Fa. Carl Zeiss, Elko III) nach den Angaben und unter Verwendung der Biochemica Test Combination, Boehringer, Mannheim, Best.-Nr.: 15987 (alkalische Phosphatase), 15988 (saure Phosphatase), 15984 (Cholinesterase), 15852 (LAP), 15993 (G-6-PDH), 15950 TTAA (Trypsin) und 15951 (Chymotrypsin). Die Aktivität der Fermente alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Cholinesterase und LAP wurde in frisch gewonnenem menschlichem Serum, die Aktivität von G-6-PDH im Hämolysat (hergestellt nach den Angaben der Biochemica Test Combination) gemessen. Für die Fermente Trypsin und Chymotrypsin standen folgende Laborpräparate zur Verfügung: Trypsin 1:250 "Difco" certified, 0125-15, Difco Laboratories, Detroit 1 Michigan USA und Chymotrypsin A für analytische Zwecke, 15139 ECAA, Boehringer, Mannheim. Von Trypsin wurde eine etwa 0,025 %ige von Chymotrypsin eine etwa 0,01 %ige Ausgangslösung hergestellt.

a) alkalische Phosphatase

Die Fermentbestimmung erfolgte mit den Reagenzien der Biochemica Test Combination Best.-Nr.: 15987. Verwendet wurde frisches hämolysefreies Serum. In folgenden Untersuchungsproben wurde die Enzymaktivität bestimmt:

- | | | | |
|---------|---------------|--------|------------------|
| a_1 : | Serum + NaCl | 0,9 % | $\bar{a}\bar{a}$ |
| a_2 : | Serum + FL-70 | 0,16 % | $\bar{a}\bar{a}$ |
| a_3 : | Serum + FL-70 | 0,32 % | $\bar{a}\bar{a}$ |

Durchführung:

0,1 ml der betreffenden Untersuchungsprobe (a_1 , a_2 , a_3) wurden mit 1 ml Lösung 2 (= 50 mM Glycinpuffer, pH = 10,5; 0,5 mM $MgCl_2$; 5,5 mM Natrium-p-nitrophenylphosphat) gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde das Gemisch mit 10 ml 0,02 M

NaOH versetzt, in eine Glasküvette (1 cm Schichtdicke) gegossen und die Extinktion (E) bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen einen Leerwert gemessen. Zur Herstellung des Leerwertes wurden 1 ml Lösung 2 30 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend mit 10 ml 0,02 NaOH und 0,1 ml der betreffenden Untersuchungsprobe (a_1 , a_2 , a_3) vermischt.

Die Berechnung der Enzymaktivität in mU erfolgte nach folgender Formel: $E_{405 \text{ nm}} \times 200 = \text{mU/ml}$.

Ergebnis

Bei wiederholter photometrischer Bestimmung der drei Untersuchungsproben wurden folgende Werte gemessen:

a_1 :	Serum + NaCl	0,9	% :	18 mU/ml
a_2 :	Serum + FL-70	0,16	% :	18 mU/ml
a_3 :	Serum + FL-70	0,32	% :	17 mU/ml

Alle drei Untersuchungsproben wiesen nahezu gleiche Fermenteinheiten/ml auf. Eine Hemmung der alkalischen Phosphatase durch FL-70 konnte also nicht angenommen werden.

b) saure Phosphatase

Die Fermentbestimmung erfolgte mit den Reagenzien der Biochemica Test Combination Best.-Nr.: 15 988. Verwandt wurde frisches hämolysefreies Serum. In folgenden Untersuchungsproben wurde die Enzymaktivität bestimmt:

b_1 :	Serum + NaCl	0,9	%	$\bar{a}\bar{a}$
b_2 :	Serum + FL-70	0,16	%	$\bar{a}\bar{a}$
b_3 :	Serum + FL-70	0,32	%	$\bar{a}\bar{a}$

Durchführung:

0,2 ml der betreffenden Untersuchungsprobe (b_1 , b_2 , b_3) wurden mit 1 ml Lösung 2 (= 50 mM Citratpuffer, pH = 4,8; 5,5 mM Natrium-p-Nitrophenylphosphat) gemischt und 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 10 ml 0,02 N NaOH versetzt, in eine Glasküvette (1 cm Schichtdicke) gegossen und die Extinktion (E) bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen einen Leerwert gemessen. Zur Herstellung des Leerwertes wurden 1 ml Lösung 2 30 Minuten bei 37° C inkubiert und anschließend mit 10 ml 0,02 N

NaOH und 0,2 ml der betreffenden Untersuchungsprobe (b_1 , b_2 , b_3) vermischt.

Die Berechnung der Enzymaktivität in mU erfolgte nach folgender Formel: $E_{405 \text{ nm}} \times 101 = \text{mU/ml}$.

Ergebnis

Bei wiederholter photometrischer Bestimmung der drei Untersuchungsproben wurden folgende Werte gemessen:

b_1 :	Serum + NaCL	0,9	% :	5,2 mU/ml
b_2 :	Serum + FL-70	0,16	% :	3,9 mU/ml
b_3 :	Serum + FL-70	0,32	% :	2,4 mU/ml

Aus den Werten war eine deutliche Hemmung der sauren Phosphatase durch FL-70 ersichtlich.

c) Cholinesterase

Die Fermentbestimmung erfolgte mit den Reagenzien der Biochemical Test Combination Best.Nr.: 15 984. Verwandt wurde frisches hämolysefreies Serum. In folgenden Untersuchungsproben wurde die Enzymaktivität bestimmt:

c_1 :	Serum + NaCl	0,9	%	$\bar{a}\bar{a}$
c_2 :	Serum + FL-70	0,16	%	$\bar{a}\bar{a}$
c_3 :	Serum + FL-70	0,32	%	$\bar{a}\bar{a}$

Durchführung:

0,02 ml der betreffenden Untersuchungsprobe (c_1 , c_2 , c_3) wurden mit 3 ml Lösung 1 (50 mM Phosphatpuffer, pH = 7,2; 0,25 mM Dithiobisnitrobenzoesäure) und 0,1 ml Lösung 2 (0,156 M Acetylthiocholin-jodid) in eine Glasküvette (1 cm Schichtdicke) gegossen, mit einem Plastikspatel gemischt und sofort die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm abgelesen. Nach genau 30, 60 und 90 Sekunden wurde die Ablesung wiederholt. Aus den Extinktionsdifferenzen pro 30 Sekunden wurde der Mittelwert $\bar{D}_E$ gebildet.

Die Berechnung der Enzymaktivität in mU erfolgte nach folgender Formel: $\bar{D}_E \times 23400 = \text{mU/ml}$.

Ergebnis

Bei wiederholter photometrischer Bestimmung der drei Untersuchungsproben wurden folgende Werte gemessen:

c ₁ :	Serum + NaCl	0,9	% :	1544 mU/ml
c ₂ :	Serum + FL-70	0,16	% :	1615 mU/ml
c ₃ :	Serum + FL-70	0,32	% :	1640 mU/ml

Alle drei Untersuchungsproben wiesen nahezu gleiche Ferment-einheiten pro ml auf. Eine Hemmung der Cholinesterase durch FL-70 konnte also nicht angenommen werden.

) LAP

Die Fermentbestimmung erfolgte mit den Reagenzien der Biochemica Test Combination Best. Nr.: 15 952. Verwandt wurde frisches hämolysefreies Serum. In folgenden Untersuchungsproben wurde die Enzymaktivität bestimmt:

d ₁ :	Serum + NaCl	0,9	%	$\overline{\overline{aa}}$
d ₂ :	Serum + FL-70	0,16	%	$\overline{\overline{aa}}$
d ₃ :	Serum + FL-70	0,32	%	$\overline{\overline{aa}}$

Durchführung:

3 ml Lösung 1 (80 mM Phosphatpuffer pH = 7,2) wurden mit 0,1 ml Lösung 2 (25 mM L-Leucin-p-nitranilid) gemischt und 5 Minuten bei 25° C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 0,1 ml der betreffenden Untersuchungsprobe (d₁, d₂, d₃) versetzt, in eine Glasküvette (1 cm Schichtdicke) gegossen und die Extinktion E₁ bei einer Wellenlänge von 405 nm abgelesen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 25° C erfolgte die zweite Ablesung (E₂).

Die Berechnung der Enzymaktivität in mU erfolgte nach folgender Formel: $(E_2 - E_1) \times 108 = \text{mU/ml}$.

Ergebnis

Bei wiederholter photometrischer Bestimmung der drei Untersuchungsproben wurden folgende Werte gemessen:

d₁: Serum + NaCl 0,9 %: 8,4 mU/ml

d₂: Serum + FL-70 0,16 %: 9,1 mU/ml

d₃: Serum + FL-70 0,32 %: 7,4 mU/ml

Alle drei Untersuchungsproben wiesen nahezu gleiche Fermenteinheiten/ml auf. Eine Hemmung der LAP durch FL-70 konnte also nicht angenommen werden.

e) G-6-PDH

Die Fermentbestimmung erfolgte mit den Reagenzien der Biochemica Test Combination Best.-Nr.: 15 993 TGAC. Verwandt wurde frisch zubereitetes HämolySAT, welches wie folgt hergestellt wurde: 0,2 ml Blut wurden 3 x mit je 2 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und nach jeder Waschung 10 Minuten bei ca. 3 000 U/min zentrifugiert. Die gewaschenen zentrifugierten Erythrozyten wurden in 0,5 ml Lösung 4 (ca. 0,02-proz. Digitonin) suspendiert, 15 Minuten bei ca. + 4°C stehengelassen und erneut zentrifugiert. Vom Überstand wurden folgende Untersuchungsproben hergestellt:

e₁: HämolySAT + NaCl 0,9 % $\bar{a}\bar{a}$

e₂: HämolySAT + FL-70 0,16 % $\bar{a}\bar{a}$

e₃: HämolySAT + FL-70 0,32 % $\bar{a}\bar{a}$

Durchführung:

3 ml Lösung 1 (0,05 M Triäthanolaminpuffer, pH = 7,6; 0,005 M Äthylen-diamin-tetraacetat) wurden mit 0,1 ml Lösung 2 (0,01 M NADP) und 0,1 ml der betreffenden Untersuchungsprobe (e₁, e₂, e₃) gemischt und 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 0,05 ml Lösung 3 (0,031 M Glukose-6-phosphat) versetzt, in eine Glasküvette (1 cm Schichtdicke) gegossen und die Extinktion bei 366 nm abgelesen. Nach genau 1, 2 und 3 Minuten wurden die Ablesung wiederholt. Aus den Extinktionsdifferenzen pro Minute wurde der Mittelwert $\bar{D}_E$ gebildet.

Die Berechnung der Enzymaktivität in mU erfolgte nach folgender Formel: $\bar{D}_{E\ 366\ nm} \times 29550 = \text{mU/Erythrozytenzahl in 1 ml Blut.}$

Ergebnis

Bei wiederholter photometrischer Bestimmung der drei Untersuchungsproben wurden folgende Werte gemessen:

e ₁ :	Hämolysat + NaCl	0,9 %:	287 mU/2,76 x 10 ⁹ Ery.
e ₂ :	Hämolysat + FL-70	0,16 %:	192 " " "
e ₃ :	Hämolysat + FL-70	0,32 %:	148 " " "

Bei der Bestimmung der Gl-6-PDH-Aktivität wird folgender Vorgang photometrisch verfolgt (RICHTERICH, 1968):

Glukose-6-Phosphat + NADP $\xrightarrow{\text{G-6-PDH}}$ 6-Phosphogluconat + NADPH₂. FL-70 wirkte sich also auf diesen Reduktionsprozess hemmend aus.

f) Trypsin

Die Fermentbestimmung erfolgte mit den Reagenzien der Biochemica Test Combination Best.-Nr.: 15 950. Verwendet wurde das Laborpräparat: Trypsin 1:250 "Difco" certified, 0,125-15, Difco Laboratories, Detroit 1 Michigan USA, von dem eine etwa 0,025 %ige Fermentlösung hergestellt wurde. In folgenden Untersuchungsproben wurde die Enzymaktivität bestimmt:

f ₁ :	Fermentlösung + NaCl	0,9 %	aā̄
f ₂ :	Fermentlösung + FL-70	0,16 %	aā̄
f ₃ :	Fermentlösung + FL-70	0,32 %	aā̄

Durchführung

2 ml Lösung 1 (0,2 M Tris-Puffer, pH = 7,8; 25 ml mM CaCl₂) wurden mit 0,2 ml Lösung 2 (12 mM Benzoylarginin-p-nitranilid) gemischt und 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschliessend wurde das Gemisch mit der betreffenden Untersuchungsprobe (f₁, f₂, f₃) versetzt und die Extinktion E₁ bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 25°C erfolgte die zweite Ablesung (E₂).

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach folgender Formel: (E₂ - E₁) x 80,8 = mU/ml.

Ergebnis

Bei wiederholter photometrischer Bestimmung der drei Untersuchungsproben wurden folgende Werte gemessen:

f ₁ :	Fermentlösung + NaCl	0,9 %:	7,4 mU/ml
f ₂ :	Fermentlösung + FL-70	0,16 %:	7,0 mU/ml
f ₃ :	Fermentlösung + FL-70	0,32 %:	7,2 mU/ml

Alle drei Untersuchungsproben wiesen nahezu gleiche Fermenteinheiten/ml auf. Eine Hemmung des Trypsins durch FL-70 konnte also nicht angenommen werden.

g) Chymotrypsin

Die Fermentbestimmung erfolgte mit den Reagenzien der Biochemica Test Combination Best.-Nr.: 15 951 TCAC. Verwandt wurde das Laborpräparat: Chymotrypsin A für analytische Zwecke, 15 139 ECAA, Boehringer, Mannheim, von dem eine etwa 0,01 %ige Fermentlösung hergestellt wurde. In folgenden Untersuchungsproben wurde die Enzymaktivität bestimmt:

g_1 :	Fermentlösung + NaCl	0,9 %	$\bar{a}\bar{a}$
g_2 :	Fermentlösung + FL-70	0,16 %	$\bar{a}\bar{a}$
g_3 :	Fermentlösung + FL-70	0,32 %	$\bar{a}\bar{a}$

Durchführung:

2 ml Lösung 1 (0,5 M Tris-Puffer, pH = 7,5; 66 mM CaCl_2) wurden mit 0,2 ml Lösung 2 (48 mM Carboxypropionyl-phenylalanin-p-nitranilid) gemischt und 5 Minuten bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit der betreffenden Untersuchungsprobe (g_1 , g_2 , g_3) versetzt und die Extinktion E_1 bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 25°C erfolgte die zweite Ablesung (E_2).

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach folgender Formel:
 $(E_2 - E_1) \times 40,4 = \text{mU/ml}$.

Ergebnis

Bei wiederholter photometrischer Bestimmung der drei Untersuchungsproben wurden folgende Werte gemessen:

g_1 :	Fermentlösung + NaCl	0,9 %:	2,7 mU/ml
g_2 :	Fermentlösung + FL-70	0,16 %:	2,9 mU/ml
g_3 :	Fermentlösung + FL-70	0,32 %:	2,8 mU/ml

Alle drei Untersuchungsproben wiesen nahezu gleiche Fermenteinheiten/ml auf. Eine Hemmung des Chymotrypsins durch FL-70 konnte also nicht angenommen werden.

IV. DISKUSSION

Die Methoden zur Prüfung antiphlogistischer Substanzen im Tierexperiment sind heute sehr zahlreich. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, gebräuchliche und aussagekräftige Entzündungstests herauszugreifen, um die antiphlogistische Wirkung von FL-70 zu untersuchen.

Eine entscheidende Rolle bei der frischen Entzündung spielt das begleitende Oedem. Einerseits schafft es die Grundlage für die Bindegewebsproliferation, die zur Regeneration des geschädigten Gewebes führt, andererseits stört ein Übermaß an oedematösem Gewebe den normalen Heilungsverlauf oder bildet sogar einen idealen Nährboden für die Ausbildung von Sekundär-Infektionen (KRUEGER, 1967). Die Beherrschung des entzündlichen Oedems ist somit unbedingte Voraussetzung, um das noch teleologisch zweckmäßige entzündliche Geschehen von überschießenden Reaktionen abzugrenzen.

Die Wirkungsintensität der praktisch wichtigsten Antiphlogistika ist bei den einzelnen experimentellen Oedemarten durchaus nicht gleich (WAGNER-JAUREGG und JAHN, 1963; WILHELMI, 1966; KALBHEN, CLANGEN und DOMENJOZ, 1970). Nicht nur bezüglich der Verlaufsart, sondern auch histologisch weisen die künstlich erzeugten Oedeme Unterschiede auf (WILHELMI, 1966). Eine Beurteilung von exsudationshemmenden Eigenschaften muß sich demnach auf die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen mit unterschiedlicher Oedemauslösung stützen können.

Eine optisch eindrucksvolle Demonstration der gestörten Permeabilitätsverhältnisse an den Gefäßen bietet die intravenöse Trypanblauinjektion nach intracutaner Reizung mit Pyrexal^R. Sowohl der Durchmesser der entstehenden Blauhöfe, als auch die Schwellung (Hautdickenzunahme) über den Pyrexalquaddeln können zur Beurteilung einer exsudationshemmenden Eigenschaft herangezogen werden. Beide Kriterien sprachen für einen deutlichen antiexsudativen Effekt von FL-70.

Wegen der hohen Streuungsquote bei der formalininduzierten Peritonitis der Ratte bevorzugen manche Autoren heute die durch Silbernitrat erzeugte Pleuritis (WILHELMI, 1966). Dennoch konnte im konventionellen Experiment eine statistisch gesicherte Hemmung der Exsudation durch FL-70 nachgewiesen werden. Eine Beeinflussung des Leukozyten- und Eiweißgehaltes im Peritonealexsudat konnte nicht erreicht werden.

Beim kombinierten Formalin-Macrodexoedem der Rattenpfote wurde in der Reizsubstanz eine Formalinkonzentration von 2% erreicht. Diese Konzentration genügt, um im Pfootengewebe neben zirkulatorischen, osmotischen und Permeabilitäts-Alterationen auch nekrotische Prozesse auszulösen (WILHELM, 1966; KALBHEN, CLANGEN und DOMENJOZ, 1970). Auf diesen Umstand läßt sich evtl. die geringe Beeinflussung der beschriebenen experimentellen Oedemform durch FL-70 zurückführen. Eine Untersuchung an andersartig ausgelösten Pfootenoedemen (z. B. Ovalbumin-, Sero-tonin-, Dextran-, Kaolin-, Aerosil-Oedem) ist angezeigt.

In einem ersten Versuch zur Terpentingölentzündung am Kaninchen wurden die Terpentinquaddeln zunächst an der seitlichen Bauchwand gesetzt. Da das sich bildende massive Oedem der Schwerkraft folgend nach unten abzusacken begann, war eine Beurteilung der Hautdickenzunahmen am Injektionsort nicht mehr möglich. Im folgenden Versuch wurde deshalb darauf geachtet, daß die Quaddeln genau in die Medianlinie am tiefsten Punkt zu liegen kamen. Die Messungen ergaben eine eindeutige Schwellungsverminderung bei den mit FL-70 behandelten Tieren. Nach den Versuchsergebnissen kann ferner eine Hemmung der degenerativen Prozesse am Injektionsort in Erwägung gezogen werden, da nur ein Tier der behandelten Gruppe eine Nekrose entwickelte, während in der Kontrollgruppe drei Tiere Nekrosen aufwiesen.

Die Granulomtasche nach SELYE ist eine chronische Modellentzündung, bei der man durch subcutane Injektion von Luft und Krotönöl in die Rückenhaut einen granulomatösen Hohlkörper mit meist hämorrhagischem Exsudat erzeugt. Dieser wird nach 14-tägiger Medikation der zu prüfenden Substanz herausgeschält und nach Entleerung und Messung des Exsudats gewogen. Die Resultate zeigen einen intensiven antiproliferativen (Wachstumshemmung des entzündlichen Granulomgewebes) und antiexsudativen Effekt von FL-70.

Bei der Entwicklung der entzündlichen Reaktion an der Impfstelle einer cutanen oder intracutanen Vacciniainfektion spielt neben der Gewebsalteration durch lokale Virusvermehrung die zellulär gebundene Abwehrreaktion eine große Rolle (GROTHEMEYER, 1966; HEILMEYER, 1966; HERRLICH, 1967; PARONETTO, KOFFLER und MIESCHER, 1968). Eine Beeinflussung letzterer Komponente durch FL-70 ist unwahrscheinlich, da bei Unterdrückung der Gewebeabwehr mit einem schweren septicämisch verlaufenden Krankheitsbild zu rechnen wäre (GROTHEMEYER, 1966) und nicht mit einer

starken Hemmung der entzündlichen Reaktionen, wie sie im Versuch bei den mit FL-70 behandelten Tieren nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte FL-70 den Krankheitsverlauf der EAE (siehe unten), bei welcher der zellgebundenen Spätreaktion der pathogenetische Vorrang gebührt (PATERSON, 1960; FRICK und SCHEID-SEYDEL, 1962; GEORGI, HONEGGER, RIEDER und WÜTHRICH, 1963; KUWERT, 1968), in keiner Weise beeinflussen. Inwieweit virostatistische und interferoninduzierende Eigenschaften von FL-70, die z. Zt. von SÖLTL (1972) untersucht werden, bei der Unterdrückung der entzündlichen Reaktionen am Ort der Infektion eine Rolle spielen, kann noch nicht erlassen werden.

Wie bereits in der Diskussion zum Versuch über die cutane und intracutane Vacciniainfektion erwähnt wurde, entfaltete FL-70 auf den Ablauf der experimentell allergischen Encephalomyelitis keinerlei Wirkung. Eine Beeinflussung der spezifischen zellulären Immunreaktion durch FL-70 ist somit unwahrscheinlich.

Mit der Senfölschemosis des Kaninchens sollte die lokale Wirksamkeit von FL-70 getestet werden. In einem Vorversuch wurde zunächst nachgewiesen, daß nach wiederholter Einträufelung von FL-70 0,32% in den Konjunktivalsack des Kaninchens keine entzündlichen Reaktionen am Auge auftraten; eine Reizwirkung der zu testenden Substanz auf das Auge konnte somit ausgeschlossen werden. Während einer Beobachtungszeit von 5 Tagen konnte keine Beeinflussung der Senfölschemosis durch lokale Applikation von FL-70 erzielt werden. Eine Überprüfung von FL-70 am UV-Erythem des Meerschweinchens (WILHELM, 1949) könnte weitere Klärung über ihre lokale Wirksamkeit verschaffen.

Die Bedeutung der Zellfermente beim Ablauf eines entzündlichen Geschehens mag durch die Tatsache veranschaulicht werden, daß bereits in den ersten 60 Minuten nach Entzündungsbeginn spezielle Enzyme, wie z. B. die β -Glukuronidase oder Amino-peptidase am Krankheitsort vermehrt nachweisbar sind (LINDNER, 1966). Die Enzyme nehmen heute einen Mittelpunkt in der Entzündungsforschung ein (HARWERTH, 1966; LINDNER, 1966; SCHILLING, 1966; SELYE, 1966; BAZIN und DELAUNAY, 1968; KALBHEN, CLANGEN und DOMENJOZ, 1970). Ihre Aktivierung und Synthese, besonders hydrolytischer Fermente, ist z. T. deutlich abhängig von der Art des Entzündungsreizes. Der Mechanismus ihrer Freisetzung aus dem Zytoplasma oder den Mitochondrien ist noch weitgehend ungeklärt (KRÖNER, 1971). Von besonderem Interesse sind die Hydrolasen, da

sie am Abbau von Grundsubstanz im Entzündungsfeld beteiligt sind (LINDNER, 1966). In vorliegendem Versuch wurde deshalb der Einfluß von FL-70 auf die Fermentaktivität der Hydrolasen alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Cholinesterase, Leucinaminopeptidase und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase untersucht; ferner wurde die Wirkung von FL-70 auf Trypsin und Chymotrypsin untersucht.

Die Hemmwirkung von FL-70 auf die Aktivität der sauren Phosphatase und den durch G-6-PDH aktivierten Reduktionsprozeß von NADH könnte einen Beitrag zur Aufdeckung des antiphlogistischen Wirkungsmechanismus von FL-70 bilden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

An verschiedenen in der Entzündungsforschung gebräuchlichen Tierversuchen wurde die antiphlogistische Wirkung von FL-70 geprüft. Ferner wurde der Einfluß von FL-70 auf die Aktivität verschiedener Fermente untersucht.

1. Am lokalen Entzündungsreiz mittels Pyrexal^R und anschließender intravenöser Trypanblauinjektion konnte die hemmende Wirkung von FL-70 auf die Gefäßpermeabilität gezeigt werden.
2. FL-70 bewirkte eine signifikante Unterdrückung der Exsudation bei der formalininduzierten Peritonitis der Ratte.
3. Eine leichte Hemmung des Formalin-Macrodexoedems der Rattenpforte durch FL-70 konnte statistisch nicht gesichert werden.
4. Die Schwellungsreaktion bei der Terpentinölentzündung des Kaninchens konnte durch FL-70 deutlich eingeschränkt werden.
5. Am Granulombeutelttest nach SELYE erwies sich die hemmende Wirkung von FL-70 auf die Exsudation und auf die Ausbildung des Granulationsgewebes.
6. Die entzündlichen Reaktionen bei der epicutanen Vaccinia-Infektion des Kaninchens wurden durch FL-70 deutlich abgeschwächt. Eine Beeinflussung der intracutanen Vacciniainfektion durch FL-70 konnte durch Messung der Hautdickenzunahmen an den Impfquaddeln nicht nachgewiesen werden.
7. Die experimentell allergische Encephalomyelitis konnte durch FL-70 nicht verhindert werden.
8. Die lokale Applikation von FL-70 bei der Senfölschemosis des Kaninchens hatte keinen Erfolg.
9. Von den untersuchten Fermenten alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Cholinesterase, Leucinaminopeptidase, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, Trypsin und Chymotrypsin wurde nur die saure Phosphatase in ihrer Aktivität durch FL-70 gehemmt. Ferner konnte nachgewiesen werden, daß FL-70 folgenden, durch die G-6-PDH aktivierten, Reduktionsprozeß hemmte:



Auf die Bedeutung der Enzyme beim Ablauf einer Entzündung wird hingewiesen.

In Tab.4 sind die Versuchsergebnisse hinsichtlich der antiphlogistische Wirksamkeit von FL-70 zusammengefasst.

TABELLE 4

Die antiphlogistische Wirksamkeit von FL-70 bei verschiedenen Untersuchungen

	antiphlogistische Wirkung
1. Hemmung der Gefäßpermeabilität	+
2. Formalinperitonitis der Ratte	+
3. Formalin-Macrodex-Ödem der Rattenpote	(+)
4. Terpentinölentzündung des Kaninchens	+
5. Granulombeutelttest nach SELYE	+
6. Cutane und intracutane Vacciniainfektion des Kaninchens	+
7. Experimentell allergische Encephalomyelitis des Kaninchens	-
8. Senfölschemosis des Kaninchens	-
9. Hemmung der Fermentaktivität	+, -

Herrn Prof. Dr. H. STICKL danke ich für die
Überlassung und Leitung der Arbeit,
Herrn Dr. H. HUBER für die hilfsbereits Un-
terstützung bei der Durchführung der Versu-
che.

VL LITERATURVERZEICHNIS

BAZIN, S., und A. DELAUNAY:

Modifications in activity of different proteolytic enzymes in inflamed tissues of normal and oxyphenbutazone treated rats.

In: J. LINDNER und E. WILHELMI: Die infektiöse Entzündung.

Hans Huber, Bern/Stuttgart 1968, S.151-171.

BOAKE, W.C., und R.R.H. LOVELL:

The necrotizing activity of human sera for guinea-pig skin.

Brit. J. exp. Path. 35, 350 (1954)

DOMENJOZ, R., K. MÖRSDORF, E.G. STENGER, und W. THEOBALD:

Der Einfluss der Narkose auf die Wirkung von Natriumsalicylat und Phenylbutazon (Butazolidin Geigy) am tierexperimentellen Pfotenödem der Ratte.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 230, 325-327 (1957)

FRICK, E., und L. SCHEID-SEYDEL:

Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen allergischen Encephalomyelitis.

Dtsch. Zeitschrift f. Nervenheilkunde 183, 363-376 (1962)

GDYNIA, R.:

Der Einfluss von Oxyphenbutazon und anderen Anti-phlogistica auf experimentelle exsudative Entzündungen.

In: LINDNER und E. WILHELMI: Die infektiöse Entzündung.

Hans Huber, Bern/Stuttgart 1968, S.413-417.

GEORGI, F., C.G. HONEGGER, H.P. RIEDER, und R. WÜTHRICH:

Beeinflussung der experimentellen allergischen Encephalomyelitis durch ein Cytostatikum der Methylhydrazidreihe.

Helv. Physiol. Acta 21, 381-393 (1963)

- HARRISON, R. G., und P. J. O. DONELL:
The Anti-Inflammatory Effect of Benzydamine.
Toxicol. Appl. Pharmac. 17, 355-360 (1970)
- HARWERTH, H. G.:
Die Entzündung.
Urban und Schwarzenberg, Berlin/München 1966.
- HEILMEYER, L.: Allophlogistie.
In: R. HEISTER und H. HOFMANN: Die Entzündung.
Grundlagen und pharmakologische Beeinflussung.
Urban und Schwarzenberg, Berlin/München 1966,
S. 3-11
- HENDERSHOT, L. C., und J. FORSAITH:
Antagonism of the frequency of Phenylquinoneinduced
writhing in the mouse by weak analgesics and non-
analgesics.
J. Pharmac. 125, 237 (1959)
- HERRLICH, A.: Die Pocken. Erreger, Epidemiologie und klinisches
Bild.
2. Auflage. Thieme, Stuttgart 1967
- HEUBNER, W., und W. ALBATH:
Über die entzündungswidrige Wirkung des Rein-Azu-
lens auf Matricia Chamomilla.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac.
192, 383-388 (1939)
- HILLEBRECHT, J.:
Zur routinemässigen Prüfung antiphlogistischer Sub-
stanzen im Rattenpfotentest.
Arzneim. Forsch. (Drug. Res.) 4, 607 (1954)
- HUBER, H., V. HOCHSTEIN-MINTZEL, und H. STICKL:
Der Einfluss homo- und heterologer Vaccinia-Anti-
körper auf die kutane Vaccinia-Infektion des Kanin-
chens.
Z. Immun.-Forsch. 152, 315-318 (1971)

- KALBHEN, D.H., H. CLANGEN und R. DOMENJOZ:
Erste Untersuchungen zur entzündungshemmenden
Wirkung von Pentosanpolysulfat auf verschiedene
Ödemformen der Rattenpfoten.
Arzneim.-Forsch. (Drug.Res.) 20, 1872-1874
(1970)
- KRÖNER, H.: Zellschädigung und Serumenzyme. Ein Beitrag
zum Mechanismus der Enzymausschüttung.
Dtsch.Med.Wschr. 13, 551-553 (1971)
- KRUEGER, G.A.W.:
Entzündungsbehandlung in der Allgemeinpraxis
mit einem neuen, nichtsteroiden Antiphlogistikum.
Therapiewoche 17, 46, 1873 (1967)
- KUESTER, F.: Ein vernachlässigter Aspekt der Entzündungs-
forschung.
in: J. LINDNER und E. WILHELMI: Die infektiöse
Entzündung.
Hans Huber, Bern/Stuttgart 1968 S. 277-285.
- KUWERT, E.: Der Einfluß von Oxyphenbutazon und Phenylbutazon
auf den Ablauf der experimentellen Immunoence-
phalitis.
In: J. LINDNER und E. WILHELMI: Die infektiöse
Entzündung.
Hans Huber, Bern/Stuttgart 1968, S.117-128
- LEVIN, S., und E.J. WENK:
Rapide passive transfer of allergic encephalo-
myelitis.
J. Immunol. 99, 1277 (1967)
- LINDNER, J.: Morphologie, Biochemie und Radiochemie der
Entzündung.
In: R. HEISTER und H. HOFMANN: Die Entzündung.
Grundlagen und pharmakologische Beeinflussung.
Urban und Schwarzenberg, Berlin/München 1966,
S. 12-32.
- LINDNER, J., und E. WILHELMI:
Die infektiöse Entzündung.
Hans Huber, Ber/Stuttgart 1968

- MACH, C.: (Laboratorium für Grenzflächenphysik und Kolloidchemie, 8011 München-Kirchseeon): pers. Mitteilung.
- MACH, C.: Kurzfassung einer Monographie über Anti-Entkoppeler der Atmungskette.
In Vorbereitung (1971)
- PARONETTO, F., D. KOFFLER, und P. A. MIESCHER:
Immunologic aspects of microbial inflammation.
In: J. LINDNER und E. WILHELMI: Die infektiöse Entzündung.
Hans Huber, Bern/Stuttgart 1968, S. 107-116
- PATERSON, P. Y.:
Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells.
J. exp. Med. 111, 119-136 (1960)
- RICHTERICH, R.: Klinische Chemie. Theorie und Praxis.
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt 1968
- SCHILLING, F.: Die Entzündung.
Urban und Schwarzenberg, Berlin/München 1966.
- SELYE, H.: Use of "Granuloma Pouch" Technic in the Study of Antiphlogistic Corticoids.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 82, 328 (1953)
- SELYE, H.: Die Entzündung.
Urban und Schwarzenberg, Berlin/München 1966.
- SÖLTL, D.: München, Med. Diss. von 1972.
In Vorbereitung
- TEDESCHI, G., G. WILHELMI, und E. MARTINI:
Azione del fenilbutazone e di altri farmaci antireumatici sui processi essudativi delle sierose.
Minerva Med. 49, 618 (1958)

- VOGEL, H. G.: Das Glasstabgranulom, eine Methode zur Untersuchung der Wirkung von Corticosteroiden auf Gewicht, Festigkeit und chemische Zusammensetzung des Granulationsgewebes an Ratten.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 1911-1918 (1970)
- VORLAENDER, K. O.: Der Wirkungsmechanismus der parenteralen Gewebe- und Reizkörper-Therapie.
In: K. F. BAUER. Ergebnisse der medizinischen Grundlagenforschung. Band I.
Thieme, Stuttgart 1956, S. 401-24
- WAGNER-JAUREGG, T., und U. JAHN: Das Rattenpfoten-Aerosilödem und seine Beziehungen zu anderen Entzündungstesten (Vergleich von Phenylbutazon mit 2-Aminochinoxalin).
Helv. physiol. pharmacol. Acta 21, 65-76 (1963)
- WILHELMI, G.: Schweiz. med. Wschr. 79, 577 (1949)
- WILHELMI, G., und R. DOMENJOZ: Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Pyrazolon und Antihistaminen bei verschiedenen Arten der experimentellen Entzündung.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 212, 125-127 (1950)
- WILHELMI, G.: Über die entzündungshemmende Wirkung von Cortison Pyrazolon und anderen Antiphlogistica.
Die Medizinische 1952, 1591
- WILHELMI, G.: Über die kombinierte Anwendung von Butazolidin (Phenylbutazon) und einigen Corticosteroiden bei experimentellen Entzündungen.
Schweiz. med. Wschr. 88, 185-188 (1958)
- WILHELMI, G.: Der Einfluss von Gichtmitteln auf experimentelle exsudative Entzündungen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 246, 51-52 (1963)

- WILHELMI, G.: Zur Methodik der Antiphlogistica-Prüfung im Tierexperiment.
In: R. HEISTER und H. HOFMANN: Die Entzündung. Grundlagen und pharmakologische Beeinflussung. Urban und Schwarzenberg, Berlin/München 1966, S. 266-277.
- WINTER, C. A.: Beurteilung der entzündungshemmenden Wirkung bei Tieren.
In: R. HEISTER und H. HOFMANN: Die Entzündung. Grundlagen und pharmakologische Beeinflussung. Urban und Schwarzenberg, Berlin/München 1966, S. 278-286
- WINTER, C. A.: Int. Symposium über Entzündung. Florenz 1971

LEBENS LAUF ·

Geboren am 15. April 1943 in Donaueschingen.

Eltern: Werner Zinn; Elfriede Zinn, geb. Fischer.

Schul Ausbildung: Volksschule von 1949 bis 1953 in Baden-Baden; anschließend Oberrealschule in Tegernsee; Abitur 1962 in Tegernsee.

Studium der Medizin: Universität München von 1964 bis 1970; Ärztliche Prüfung 1970 an der Universität München.

Berufliche Tätigkeit: Medizinalassistent an der Bayer. Landesimpfanstalt München von Januar bis April 1971; seit Juni 1971 wissenschaftlicher Angestellter an der Bayer. Landesimpfanstalt.

